



DEUTSCHES
PATENTAMT

21 Aktenzeichen: P 37 44 113.2-23
22 Anmeldetag: 24. 12. 87
43 Offenlegungstag: 14. 7. 88
65 Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 9. 4. 88

DE 37 44 113 C 2

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

30 Unionspriorität:

948269 31.12.88 US
113791 27.10.87 US

73 Patentinhaber:

ABS Global, Inc., New York, N.Y., US

74 Vertreter:

Uexküll & Stolberg, 22807 Hamburg

72 Erfinder:

First, Neal L., Madison, Wis., US; Barnes, Frank,
Madison, Wis., US; Prather, Randall S., Madison,
Wis., US; Robl, James M., Belchertown, Mass., US

56 Für die Beurteilung der Patentfähigkeit
in Betracht gezogene Druckschriften:

»Grefte Nucleaire Totale, Simple ou Multiple, Chez
une Amibe«, Soc.Biol. 130, 744, (1939);
»Transplantation of Living Nuclei from Blastula Cells
into Enucleated Frogs' Eggs«, Proc.Nat.Acad.Sci.,
Vol.38:455-463 (1952);
»A Description of the Technique for Nuclear
Transplantation in *Xenopus laevis*«, J. Embryol. exp.
Morph. 8(4), 437-444 (1980);
»Transplantation of Nuclei of Various Cell Types
from Neurulae of the Mexican Axolotl (*Ambystoma*

mexicanum)«, Develop. Biol. 10, 233, (1984);
»Nuclear Transplantation in *Mus musculus*,
Developmental Potential of Nuclei from
Preimplantation Embryos«, Cell, 23, 9 (1981);
»Nuclear Transplantation in the Mouse Embryo by
Microsurgery and Cell Fusion«, Science 220, 1300
(1983);
»Inability of Mouse Blastomere Nuclei Transferred to
Enucleated Zygotes to Support Development In
Vitro«, Science 226, 1317-1319 (1984);
»Nuclear Transplantation in the Mouse: Heritable
Differences Between Paternal Genomes after
Activation of the Embryonic Genome«, Cell 45,
127-136 (1986);
»Nuclear Transplantation in Mouse Embryos:
Assessment of Recipient Cell Stage«, Biol.
Reprod. 34, 733-739 (1986);
»Nuclear Transplantation in Sheep Embryos«, 320,
63-65 (1986);
»Development of Preimplantation Embryos of the
Golden Hamster in a Defined Culture Medium«, Biol.
Reprod., 28, 235 (1983);
»Development of Porcine Ova that were Centrifuged
to Permit Visualization of Pronuclei and Nuclei, Biol.
Reprod. 32, 645 (1985);
»Production of Sendai virus for cell fusion, In Vitro, 2,
103 (1973);
»Bovine Herpes Mammillitis in Two York Dairy Herds,
J. Amer. Vet. Med. Assoc., 180, 902 (1982);

54 Verfahren zur Multiplikation von Rinderembryonen und zum Klonen von Rindern

57 Verfahren zur Kerntransplantation aus einem Rinderem-
bryo als Spender in eine Empfänger-Oocyte, dadurch ge-
kennzeichnet, daß man

- (a) einen membranumschlossenen Kern aus einer Zelle des
Spenderembryos isoliert,
- (b) das chromosomale Kernmaterial aus der Empfänger-Oo-
cyte entfernt, um eine enukleierte Empfänger-Oocyte zu
schaffen,
- (c) den membranumschlossenen Spenderkern so in der
enukleierten Empfänger-Oocyte platziert, daß seine Mem-
bran an die Membran der Oocyte angrenzt und
- (d) die Membranen des membranumschlossenen Kerns und
der enukleierten Empfänger-Oocyte elektrisch miteinander
fusioniert um eine embryonische Einzelzelle zu schaffen,
welche den Kern des Spenderembryos besitzt.

DE 37 44 113 C 2

Beschreibung

Die Erfindung betrifft allgemein ein Verfahren zum Vermehren von Rinderembryonen und insbesondere ein Verfahren zum Transplantieren der Kerne aus Spender-Rinderembryonen in enukleierte Empfänger-Oocyten, das heißt, in Oocyten, aus denen die Nuclei zuvor entfernt worden sind.

Im Bereich der Befruchtung von Tieren wird weiterhin nach fortschrittlichen Techniken zur genetischen Verbesserung und Selektion gesucht. Speziell im Hinblick auf Milchvieh sind beispielsweise signifikante Steigerungen der Milchproduktion dadurch erreicht worden, daß man in großem Umfang genetisch hochwertige Bullen und künstliche Besamung angewendet hat. Milchkühe produzieren heutzutage nahezu doppelt so viel Milch wie vor 30 Jahren. Weitere genetische Verbesserung kann durch Multiplikation von hochwertigen oder genetisch manipulierten Embryonen durch Klonen erreicht werden.

Die Transplantation von Embryonen bei Rindern ist inzwischen ein anerkanntes Verfahren zur Stützung der Produktion von genetisch hochwertigem Bestand. Das Klonen von Embryonen in Kombination mit der Möglichkeit, die geklonten Embryonen zu transplantieren machen es möglich, zahlreiche genetisch identische Tiere zu produzieren. Rinderembryonen können gegenwärtig einfach durch Zerteilen der sich entwickelnden Embryonen geklont werden; die Zahl der nach diesem Verfahren herstellbaren Klone ist jedoch auf zwei bis vier begrenzt, bis die geteilten Embryonen nicht mehr überlebensfähig sind.

Die Transplantation von Nuclei aus vielzelligen Embryonen in mehrere embryonale Einzelzellen bietet die Möglichkeit, diese Grenzen zu überwinden und ermöglicht die Produktion einer großen Zahl vervielfältigter, identischer Tiere.

Der Kerntransfer wurde erstmal im Jahre 1939 bei *Amoeba sphaeronucleus* von Comandon und de Fonbrune vorgenommen ("Greffes Nucleaire Totale, Simple ou Multiple, Chez une Amibe", Soc.Biol. 130, 744, (1939)). Es folgte im Jahre 1952 die erfolgreiche Kernübertragung bei *Rana Pipiens* durch Briggs und King ("Transplantation of living nuclei from blastula cells into enucleated frogs", Proc. Nat. Acad. Sci., Vol. 38: 455—463 (1952)). Das erfolgreiche Kernübertragungsverfahren nach Briggs und King (vgl. a.a.o.) umfaßte die folgenden Schritte:

1) Aktivierung der Empfänger-Oocyte

2) E nukleieren, d. h. das Verfahren zum Entfernen oder Inaktivieren der Chromosomen aus der Empfänger-Oocyte, und

3) Übertragen eines gesamten lysierten Blastomeren (einer Zelle, welche das Ergebnis der Embryoteilung vor der Gastrulation ist), mit einem Kern aus einem Embryo im Blastula- oder einem frühen Gastrula-Stadium zurück in die enukleierte Oocyte.

Elsdale et al. verwendeten ultraviolette Strahlung, um in einem Schritt den Ei-Pronucleus zu inaktivieren und die unbefruchtete Oocyte zu aktivieren (vgl. "A Description of the Technique for Nuclear Transplantation in *Xenopus laevis*", J. Embryol. exp. Morph. 8(4), 437—444 (1960)). Bei dem Axolotl wurde das Aktivieren durch Elektroschock beschrieben, wobei die Chromosomen des Eikerns durch ultraviolette Strahlung ausgeschaltet wurden (Briggs, R., et al., "Transplantation of Nuclei of Various Cell Types from Neurulae of the Mexican Axolotl (*Ambystoma mexicanum*)", Develop. Biol. 10, 233, (1964)). Bei all diesen Verfahren war es üblich, mit einer Mikropipette mit feiner Bohrung einen ganzen lysierten Blastomeren mit einem Kern in die enukleierte Oocyte zu übertragen.

Bei der Maus wurden für die Kernübertragung zwei Techniken angewandt. Illmensee und Hoppe wendeten eine rein operative Methode an, bei der eine Mikropipette durch die Plasmamembran in das Cytoplasma eines Embryos im Prokern-Stadium eingeführt wurde, um den Kern zu entfernen und einzuführen (vgl. Illmensee, K. und Hoppe, P.C., "Nuclear Transplantation in *Mus musculus*, Developmental Potential of Nuclei from Preimplantation Embryos", Cell, 23, 9 (1981)). McGrath und Solter haben ein nicht sprengendes Verfahren zum Transplantieren von Kernen beschrieben (McGrath, J. und Solter, D., "Nuclear Transplantation in the Mouse Embryo by Microsurgery and Cell Fusion", Science 220, 1300 (1983)). Die Kerne wurden als membranumschlossene Prokern-Karyoplasten entfernt, ohne die Plasmamembran des Embryos zu durchdringen. Der Kern wurde durch Zellfusion in die Empfängerzelle eingeführt, wobei der Sendai-Virus als fusiogenes Agens verwendet wurde. Eine kleine Menge einer Suspension von Sendai-Virus wurde nach der Entfernung des Spender-Kerns aspiriert und die Virussuspension und die Prokern-Karyoplasten nacheinander in den perivitellinen Raum des Empfänger-Embryos injiziert. Das mikrooperative Verfahren von Illmensee und Hoppe (a.a.o.) war maximal zu etwa 30 bis 40% erfolgreich, während das nicht zerstörende Verfahren von McGrath und Solter (a.a.o.) zu mehr als 90% erfolgreich war. Mit diesem Verfahren gelang es, Embryonen im Blastocystenstadium herzustellen, welche sich jedoch bisher nicht weiterentwickelten. Berichte darüber, daß Illmensee und Hoppe drei lebende Mäuse herstellen konnten, sind in Frage gestellt worden.

Später wurde berichtet, daß Embryonen im Blastocystenstadium und Mäuse durch Übertragen von Kernen in enukleierte Prokern-Zygoten nur dann hergestellt werden konnten, wenn sich die Spender-Zellen ebenfalls im Prokern-Stadium oder in einem sehr frühen Zwei-Zellstadium befanden (McGrath, J. und Solter, D., "Transferability of Mouse Blastomere Nuclei Transferred to Enucleated Zygotes to Support Development In Vitro" Science 226, 1317—1319 (1984)); Surani, M.A.H. et al., "Nuclear Transplantation in the Mouse: Heritable Differences Between Paternal Genomes after Activation of the Embryonic Genome", Cell 45, 127—136 (1986); und Robl J.M. et al., "Nuclear Transplantation in Mouse Embryos: Assessment of Recipient Cell Stage", Biol. Reprod. 34, 733—739 (1986)).

Kürzlich ist über ein Verfahren zur Kerntransplantation bei Schafen berichtet worden (Willadson, S.M., "Nuclear Transplantation in Sheep Embryos", 320, 63—65 (1986)), bei welchem Dielektrophorese zur Aktivierung und Fusion dient und Metaphase II Oocyten als Empfänger verwendet werden. Als Ergebnis dieser

Versuche wurden geklonte Lämmer geboren. Bisher sind jedoch keine Publikationen bekannt, die Methoden zur Kernübertragung bei Rindern betreffen.

Es ist daher Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zum Klonen von Rinderembryonen und zur Herstellung geklonter Rinder zu schaffen.

Es ist ferner Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zum Klonen von Rinderembryonen durch Kernübertragung zu schaffen.

Es ist eine weitere Aufgabe der Erfindung, ein Verfahren zum Transplantieren des Kerns oder eines ganzen Blastomeren mit seinem Kern aus einem Spender-Rinderembryo in eine enukleierte Empfänger-Rinder-Oocyte zu schaffen.

Das vorliegende Verfahren ist auf das Transplantieren von Kernen in Rinderembryonen gerichtet. Die Kerne werden aus den Spender-Rinderembryonen entfernt, ohne die Plasmamembran zu penetrieren und werden durch elektrisch induzierte Zellfusion in die Empfänger-Oocyten eingeführt.

Das Nucleus-Übertragungsverfahren schließt ein, daß man den Nucleus aus der Empfänger-Oocyte entfernt, den membranumschlossenen Nucleus der Spender-Embryonzelle in den perivitellinen Raum der enukleierten Empfänger-Oocyte einführt, die jeweiligen Plasmamembranen des membranumschlossenen Spendernucleus und der enukleierten Empfänger-Oocyte orientiert und die Aktivierung der Oocyte und die Fusion des membranumschlossenen Nucleus mit der enukleierten Empfänger-Oocyte elektrisch induziert. Der Zustand der Oocyte bei der Aktivierung und die Art und Weise, in welcher die Aktivierung und die Fusionschritte vorgenommen werden, sind für den erfolgreichen Kerntransfer der Spenderzellen oder der Kerne in enukleierte Rinder-Oocyten kritisch.

Das Verfahren betrifft eine Folge von Schritten, welche insgesamt das Klonen von Rinderembryonen durch Kerntransplantation bewirken. Bei dem Verfahren werden auf nicht-zerstörende Weise der Nucleus aus der Empfänger-Oocyte entfernt und der Nucleus aus dem Spender-Embryo, umschlossen von einer Membran, isoliert, indem man entweder den Nucleus aus der Spenderzelle entnimmt oder indem man einen Blastomeren selbst isoliert. Der Spender-Nucleus wird dann mit der Empfänger-Oocyte zusammengebracht und der Nucleus aus der Spender-Embryozelle wird mit Hilfe elektrisch induzierter Zellfusion in eine Empfänger-Zelle eingeführt. Im wesentlichen folgt das Verfahren zum Klonen von Rinderembryonen den folgenden fünf grundlegenden Schritten:

- 1) Auswählen eines geeigneten Empfänger-Embryos oder einer Oocyte für den Kerntransfer,
- 2) E nukleieren, d. h. Beseitigen des Kernmaterials aus der Empfänger-Oocyte,
- 3) Einführen des membranumschlossenen Nucleus des Spender-Embryos in die enukleierte Empfänger-Oocyte,
- 4) Orientieren des membranumschlossenen Spender-Nucleus und der Empfänger-Oocyte für die Zellfusion und
- 5) Fusionieren der den Spender-Nucleus umgebenden Membran mit der Membran der Empfänger-Oocyte und Aktivieren der Empfänger-Oocyte durch Dielektrophorese.

Das erfindungsgemäße Gesamtverfahren kann als Klonen oder Vervielfältigen von Embryonen und Vieh durch Kerntransfer zum Züchten zahlreicher genetisch identischer Embryonen und schließlich Tiere bezeichnet werden.

Die Bezeichnung "Oocyte" bezieht sich auf eine Zelle, welche sich aus einem Oogonium entwickelt hat und nach Durchlaufen der Meiose eine reife Eizelle wird. Es hat sich gezeigt, daß nicht alle Oocyten in gleicher Weise optimal geeignete Zellen zur wirkungsvollen Kerntransplantation bei Rindern sind. Für die Zwecke des vorliegenden Verfahrens haben sich Oocyten im Metaphase II-Stadium als optimal erwiesen, welche entweder in vivo oder in vitro gereift wurden. Reife Metaphase II-Oocyten können entweder operativ von Kühen oder Fersen mit nicht übermäßig schneller Ovulation oder mit übermäßig schneller Ovulation (Superovulation) 35 bis 48 Stunden nach dem Einsetzen des Östrus oder nach Injektion von menschlichem Chorion Gonadotropin (hCG) oder eines entsprechenden Hormons gewonnen werden. Alternativ können unreife Oocyten durch Aspiration aus Ovarfollikeln aus geschlachteten Kühen oder Fersen gewonnen werden und diese können anschließend in vitro durch geeignete Hormon-Behandlung und Kultivieren gereift werden.

Die Spenderembryonen-Zellen können durch Spülen operativ gewonnener Oviducte erhalten werden oder sie können nicht operativ nach bekannten Verfahren aus dem Uterus gespült werden. Die Spenderembryonen sollten sich in einem 2- bis 32-zelligen Entwicklungsstadium befinden, d. h. vor Eintreten einer signifikanten Zelldifferenzierung. Spenderzellen im 16- bis 32-Zellstadium werden gelegentlich eher als Morula als als Blastula bezeichnet. Trotzdem wird im Rahmen des vorliegenden Verfahrens die Bezeichnung "Blastula" für die Embryonen gewählt und die Bezeichnung "Blastomer" wird erfindungsgemäß verwendet, um Einzelzellen aus jeglichen Embryonen vor der Gastrulation zu bezeichnen.

Zur optimalen Verwendung in dem Verfahren sollte der Nucleus der Spenderzelle membranumschlossen vorliegen. Ein derartiger membranumschlossener Nucleus kann entweder aus einem gesamten Blastomeren bestehen oder er kann aus einem Karyoplasten bestehen, d. h. um eine aspirierte Zelluntereinheit, welche einen Nucleus und eine kleine Menge Cytoplasma, umschlossen von einer Plasmamembran einschließt.

Die Mikromanipulation der Rinderzellen wird in der gleichen Weise vorgenommen, wie bei McGrath und Solter (vgl. a.a.o.) beschrieben und auf welche im Zusammenhang mit Einzelheiten der Mikromanipulationstechnik Bezug genommen wird. Die Mikromanipulation wird durchgeführt, indem man eine die Zellen aufnehmende Pipette verwendet, welche einen äußeren Durchmesser von etwa 120 µm und einen inneren Durchmesser von etwa 25 bis 30 µm aufweist sowie eine schräg angeschliffene Pipette zum E nukleieren und Transferieren mit einem äußeren Durchmesser von etwa 25 bis 35 µm. Reife Oocyten sollten zunächst mit etwa 7,5 µg/ml Cytocha-

lasin B oder einem ähnlich wirksamen Mikrotubuli-Inhibitor bei einer Konzentration behandelt werden, die ausreicht, um das Einführen der Pipette zum Enukleieren und Transferieren durch die zona pellucida zu ermöglichen, um einen Teil des Cytoplasmas entfernen zu können, ohne an irgendeinen Punkt die Plasmamembran tatsächlich zu verletzen. Die reife Oocyte wird zunächst durch vorsichtiges Saugen in der Zellhaftpipette an Ort und Stelle gehalten. Die Enukleierungs- und Transfer-Pipette wird dann durch die zona pellucida der Oocyte entweder an der Metaphase II-Vorwölbung oder neben dem ersten Polkörper eingeführt, d. h. an einer Stelle, die neben den Metaphasechromosomen liegen soll. Die Pipette durchdringt die Plasmamembran nicht. Durch Aspirieren an der Pipette wird eine Zellvorwölbung in die Pipette gesaugt, wobei es sich im Falle der Metaphase II-Vorwölbung um die gesamte Vorwölbung und das umgebende Cytoplasma handelt oder im Falle des ersten Polkörpers um den Polkörper und das umgebende Cytoplasma. Bei diesem Verfahren sollten sämtliche Metaphasechromosomen in die Pipette aufgesogen werden. Wenn man die Pipette zurückzieht und weiter saugt, so streckt sich die Plasmamembran und verschließt sich anschließend wieder unter Zurücklassung einer funktionsfähigen Plasmamembran an der enukleierten Oocyte.

Die Spenderembryonen können abhängig von der Größe der Transferpipette mit Cytochalasin B behandelt werden oder nicht. Verwendet man eine Pipette von weniger als 30 µm, so empfiehlt sich die Behandlung, um das Zerreißen des Blastomers zu verhindern. Die Kerne der Spender-Embryonenzellen werden transferiert, indem man entweder einen den Nucleus enthaltenden Teil des Blastomers aspiriert und so einen Karyoplasten schafft oder indem man den gesamten Blastomer aspiriert. Vorzugsweise wird die gesamte Zelle aspiriert. Die den aspirierten, membranumschlossenen Nucleus enthaltende Transferpipette wird dann durch die zona pellucida der enukleierten Empfänger-Oocyte eingeführt und der membranumschlossene Kern wird so unter der zona pellucida deponiert, daß seine Membran an die Plasmamembran der Empfänger-Oocyte angrenzt.

Die Fusion des membranumschlossenen Kernes mit der enukleierten Empfänger-Oocyte und die gleichzeitige Aktivierung der Empfänger-Oocyte werden in einer einzigen Dielektrophoresestufe durchgeführt, wobei man wie nachfolgend beschrieben eine handelsübliche Elektrofusionsausrüstung verwendet. Vor der Elektrofusion des Spender-Embryokerns und der enukleierten Empfänger-Oocyte ist es erforderlich, die Zellmembranen in dem elektrischen Feld zu orientieren. Die Bezeichnung "orientieren" definiert das Ausrichten der beiden Zellen in der Weise, daß die Kontaktebene der beiden Membranen, d. h. der Plasmamembran des den Spenderkern tragenden Körpers und der Plasmamembran der Empfänger-Oocyte, welche miteinander fusioniert werden sollen, senkrecht zu dem elektrischen Feld liegt. Es hat sich gezeigt, daß bei Zufallsorientierung die Erfolgsrate für die Fusionierung in erheblichem Umfang sinkt. Werden die Zellen so orientiert, daß die Fusionsmembranen parallel oder in einem Winkel von etwa 45° zu dem elektrischen Feld liegen, so sinkt die Rate erfolgreicher Fusionen. Die Ausrichtung kann elektrisch oder mechanisch erfolgen. Unterscheiden sich die beiden Zellen nicht wesentlich in ihrer Größe voneinander, so kann eine kleine ausrichtende Wechselstromspannung (5 Volt/mm bei 1000 KHz) für eine kurze Zeit (10 Sekunden) die Zellen reorientieren, so daß ihre Membranen aneinander angrenzen. Es können mehrfache Impulse erforderlich sein. Unterscheiden sich die Zellen in ihrer Größe erheblich voneinander, so kann mechanisches Manipulieren erforderlich sein, um die Membranen richtig zu orientieren.

Das eigentliche Einbringen des membranumschlossenen Nucleus in eine enukleierte Rinder-Oocyte erfolgt durch ein dielektrophoretisches Zellfusionsverfahren, bei dem Gleichstrom und ein nicht-leitendes, d. h. nicht-ionisches Zellfusionsmedium wie eine Mannitollösung oder Zimmerman Zellfusionsmedium verwendet werden. Die Fusion ist das Ergebnis des Zusammenbruchs der Zellmembran und der Porenbildung zwischen den richtig einander gegenüberliegenden Zellen. Die Poren oder kleinen Kanäle, die zwischen den beiden Zellen geschaffen werden, sind wegen der hohen Oberflächenbeugung der Kanäle und der damit verbundenen hohen Spannung in der Membran instabil. Diese Instabilität läßt die Kanäle verschmelzen und sich erweitern, bis die Membranen eine einzelne Zelle bilden.

Die embryonischen Einzelzell-Klone werden vorzugsweise entweder in vivo oder in vitro bis zum Morula- oder Blastula-Stadium kultiviert. Beispielsweise können die Klone in Schaf-Oviducten oder in einem geeigneten Kulturmedium kultiviert werden. Anschließend können die Embryonen zu einem geeigneten Zeitpunkt des Östrus in die Uteri von Rindern oder anderen geeigneten Tieren transplantiert werden. Die Transplantationsverfahren sind allgemein bekannt und werden im Bereich der Embryotransplantation praktiziert. Ein Teil dieser Transplantate wird bei den Ersatz-Muttertieren Trächtigkeit auslösen. Die aus dieser Trächtigkeit hervorgehenden lebenden Kälber sind genetisch identisch, wenn die Spenderzellen aus einem einzelnen Embryo oder einem Klon desselben stammen.

Das Verfahren wird nachfolgend anhand von Beispielen erläutert.

Experimentelle Methoden

Embryonenquelle: Metaphase-Oocyten und Rinder Spender-Embryonen aus späteren Stadien wurden aus den Oviducten von geschlachteten Kühen oder Fersen mit nicht übermäßig schneller oder übermäßig schneller Ovulation 36 bis 108 Stunden nach Eintreten des Östrus gewonnen. Vorzugsweise wurden die Tiere durch zweimalige Injektion (insgesamt 2 cm³) von Natriumchlorprostenol ("Estrumate" der Miles Laboratories, Shawnee, Kansas) synchronisiert und Tiere mit übermäßig schneller Ovulation (Superovulation) wurden 4 Tage lang mit 40 mg FSH-P (Burns-Biotech Laboratories, Omaha, Nebraska) behandelt. Bei den Kerntransplantationen wurden Empfänger-Oocyten im Metaphase II-Stadium als Empfänger verwendet, welche in vivo oder in vitro gereift worden waren, und Embryonen im 2-zelligen bis 32-zelligen Stadium wurden als Spender verwendet.

Behandlung und Mikromanipulation der Embryonen: Die Embryonen wurden gewonnen und in einem TL Hepes gepufferten modifizierten Tyrodesmedium manipuliert, welches nach Bavister et al, (Development of Preimplantation Embryos of the Golden Hamster in a Defined Culture Medium", Biol. Reprod. 28, 235 (1983))

hergestellt worden war. 10 Minuten vor und während der Mikromanipulation wurden die Embryonen in ein 7,5 µg/ml Cytochalasin B enthaltendes Medium gebracht. Diesem Medium wurden ferner 0,1 µg/ml Demicolcin zugesetzt. Um die Bedingungen für die Zellfusion bei Rindern zu untersuchen, wurde ein kleiner Cytoplast aus der Empfänger-Oocyte entnommen und in den perivitellinen Raum wieder eingeführt. Für die Kerntransplantation wurden Pronucleus Empfänger-Embryonen zuerst nach einem Verfahren von Wall et al., (Development of Porcine Ova that were Centrifuged to Permit Visualization of Pronuclei and Nuclei, Biol. Reprod. 32, 645 (1985)) bei 15 000 G 3 Minuten lang zentrifugiert, um die Pronuclei sichtbar zu machen.

Die Empfänger-Oocyten wurden enukleiert, indem etwa die Hälfte des an den Polkörper angrenzenden Cytoplasmas mit einer 25 bis 35 µm Transferpipette aspiriert wurden, wobei eine enukleierte, membranumschlossene Oocyte zurückblieb. Die Nuclei aus Spenderembryonen in späteren Stadien wurden durch Aspirieren des Nucleus und eines Teils des umgebenden, membranumschlossenen Cytoplasmas aus einem Blastomer oder durch Aspirieren eines ganzen Blastomers entnommen.

Die Mikromanipulation wurde unter Verwendung einer Haltepipette mit einem äußeren Durchmesser von etwa 120 µm und einem inneren Durchmesser von etwa 30 µm und einer schräg angeschliffenen Eukleations- und Transferpipette durchgeführt, welche einen äußeren Durchmesser von etwa 25 bis 35 µm aufwies. Nuclei enthaltende Gesamtblastomere wurden aus Spenderembryonen entnommen und nach dem Verfahren von McGrath und Solter (vgl. a.a.o.) in den perivitellinen Raum der Empfänger-Oocyten überführt.

Bei den denjenigen Embryonen, bei denen die in vitro Entwicklung registriert werden sollte, wurden die Embryonen unter Paraffinöl in einer angefeuchteten, 5% CO₂ in Luft enthaltenden Atmosphäre bei 97,5° F (36,4° C) in 50 µl Tropfen modifiziertes Tyrodesmedium eingebracht.

Die Entwicklung von Embryonen in Schafoviducten wurde ebenfalls registriert. Die Embryonen wurden in Agarblocks überführt und anschließend in Schafoviducte transferiert, welche oberhalb der Tubo-Uterinen Junction abgebunden waren. 5 Tage nach dem Transfer wurden die Embryonen entnommen und die Entwicklung untersucht. Die Entwicklungsfähigkeit wurde ferner an zwei Embryonen durch Transferieren in eine Empfängerkuh untersucht.

Zellfusion: Ein Verfahren mit fusiogenen Viren (unter Verwendung von zwei verschiedenen Viren) und ein Elektrofusionsverfahren wurden für die Fusion der erfindungsgemäßen Spender- und Empfänger-Embryozellen untersucht. Sendai-Viren wurden nach dem Verfahren von Giles und Ruddle (Production of Sendai virus for cell fusion, In Vitro, 2, 103 (1973)) angezogen und inaktiviert. Der Titer von Sendai-Viren lag zwischen 6400 und 9600 Haemagglutinationseinheiten/ml untersucht an Meerschweinchen-Erythrocyten. Mit diesem Virus wurde eine Fusion von mehr als 90% bei parallelen Kerntransplantations-Versuchen bei Mäuseembryonen erhalten. Bei dem anderen untersuchten Virus handelte es sich um den Rinder-Herpesvirus 1 (Stamm NYL), erhalten von G.J. Leitchworth (Leitchworth and La Duei, Bovine Herpes Mammillitis in Two York Dairy Herds, J. Amer. Vet. Med. Assoc., 180, 902 (1982)). Der Rinder-Herpesvirus wies einen Titer von etwa 10⁷ TCID₅₀/ml auf und wurde 100-fach konzentriert. Dieser Virus bewirkt ohne Schwierigkeiten Zellfusion in Rinder-Zellgewebe-Kulturen. Beide Viren wurden verwendet wie bei McGrath und Solter beschrieben (a.a.o.). In Versuchen zum Fusionieren von Cytoplasten zu reifen Rinderembryonen wurde mit den fusiogenen Viren kein Erfolg erzielt. Daher wurden alle weiteren Fusionsversuche elektrisch durchgeführt.

Zwei verschiedene Medien, nämlich TL Hapes und Zimmerman Zellfusionsmedium (GCA Corporation, Chicago, Il) wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die Fusionsrate miteinander verglichen. Zellen aus Embryonen wurden in dem Medium gewaschen und anschließend mit dem jeweiligen Medium in eine Fusionskammer überführt. Im Anschluß an die Fusionsbehandlung wurden die Oocyten unter Paraffinöl in angefeuchteter Luft mit 5% CO₂ in 50 µl Tropfen modifiziertes Tyrodesmedium in einen Inkubator gebracht und regelmäßig auf Fusion beobachtet.

Die Aktivierung und Fusion der intakten, membranumschlossenen Nuclei mit den enukleierten Oocyten wurde in Zimmerman Zellfusionsmedium durch Dielektrophorese vorgenommen, wobei ein Zimmerman Elektrofusions Instrument, GCA Corporation, Chicago, Il, verwendet wurde. Die Fusionskammer bestand aus zwei parallelen Elektroden im Abstand von 1 mm auf einem gläsernen Objektträger. Das Instrument wurde wie folgt eingestellt:

Fusionsspannung: 100—120 Volt (Gleichstrom, DC)

Elektrodenabstand: 1 mm

Ausrichtungsspannung: 1-5 Volt (Wechselstrom, AC)

Ausrichtungsfrequenz: 1000 KHz

Impulsdauer: 10—40 µsec.

Postfusions Ausrichtungszeit: 5 Sekunden.

Der Ausrichtungsimpuls (Orientierungsimpuls) erwies sich als im wesentlichen wirkungslos bei der Ausrichtung kleiner Blastomere oder Karyoplasten, die bei Rinderzellen neben die Membran der Empfänger-Oocyte plazierte wurden. Die Ausrichtung wurde daher im wesentlichen mechanisch vorgenommen.

Der membranumschlossene Nucleus, d. h. Blastomer oder Karyoplast, und die enukleierte Oocyte wurden mechanisch mit einer Haltepipette so ausgerichtet, daß der Fusionsimpuls senkrecht durch die Grenzfläche zwischen der den Nucleus umschließenden Membran und der Membran der enukleierten Oocyte fiel. Die Embryonen wurden anschließend in vitro 18 bis 24 Stunden lang in 50 µl Tropfen modifiziertem Tyrodesmedium kultiviert und anschließend in einen Agarblock gebracht, um in den abgebundenen Oviduct einer Empfänger-Mutter wie beispielsweise eines Mutterschafs überführt zu werden.

Beispiel 1

Die Wirkung der Zell-Orientierung auf die Fusionsrate wurde zunächst an zweizelligen Mäuseembryonen

untersucht. Membranumschlossene Spenderkerne und Oocyten wurden mit einem Wechselstromimpuls von 1000 KHz und bis zu 5 Volt ausgerichtet. Nach dem Ausrichten wurden die Zellen 20 μ sec lang einem Fusionsstrom-Impuls von 100 Volt Gleichstrom (DC) ausgesetzt. Beim Fusionieren von Rinderzellen zeigte es sich, daß die geringe Größe der Spenderzellen den Zellen keine ausreichende Polarität verlieh, um das Ausrichten durch einen Wechselstromimpuls zu ermöglichen. Die Zellen wurden daher mit Hilfe einer Haltepipette mechanisch ausgerichtet.

Bei den für die Elektrofusion untersuchten Parametern handelte es sich um den Puffertyp, die Impulsspannung, die Impulsdauer und die Zellausrichtung. Wie in Tabelle 1 wiedergegeben, wurde mit dem nicht-elektrolytischen Zimmerman Zellfusionsmedium eine höhere Fusionsrate erzielt (8/9, 89%) als mit TL Hepes (1/9, 11%). Zwischen Impulsen von 100 und 120 Volt konnten keine wesentlichen Unterschiede festgestellt werden.

Tabelle 1

	Fusionsmedium	Impulsspannung, Volt (40 μ sec)	Fusioniert/ total	% Fusion
15				
20	TL Hepes	100 V	0/5	0
	TL Hepes	120 V	1/4	25
25	Zimmerman	100 V	5/5	100
	Zimmerman	120 V	3/4	75

Wie Tabelle 2 zeigt, wurden mit Impulszeiten von 20 und 40 Mikrosekunden gleichwertige Fusionsraten erzielt, während 10 Mikrosekunden weniger wirksam waren.

Tabelle 2

	Impulsspannung Volt	Impulsdauer (μ sec)	Fusioniert/ Total	% Fusion
35				
40	100 V	40 μ sec	14/18	78
	100 V	20 μ sec	15/19	79
45	100 V	10 μ sec	2/10	20

Beispiel 2

Entwicklung von Embryonen, bei denen die Pronuclei zuerst entfernt und anschließend wieder eingesetzt worden waren, wurde in vitro untersucht, um die Lebensfähigkeit von Rinderembryonen mit transplantierten Kernen zu überprüfen. Von 29 Embryonen mit auf diese Weise wieder eingesetzten Kernen entwickelten sich nach 48 Stunden in einer in vitro-Kultur 9 bis zum 7- bis 12-Zellstadium und 6 bis 4- bis 6-Zellstadium, während die restlichen 1 bis 3 Zellen aufwiesen.

Als nächstes wurden Untersuchungen mit echten Kernübertragungen aus Spender-Embryozellen in Oocyten im Prokern-Stadium durchgeführt. Die nachfolgend in zwei Teilen angelegte Tabelle 3 zeigt die Entwicklung von Kerntransplantaten und von Kontrollembryonen nach einer 5-tägigen Entwicklungszeit in einem Schafoviduct. Die Kontrollembryonen bestanden aus Embryonen, welche am gleichen Tag aus Kühen entnommen und die in den meisten Fällen kontralateral zu den Kerntransplantat-Embryonen in den Oviduct übertragen worden waren.

Tabelle 3

Kernspender	cytoplasmatischer Empfänger	Anzahl Übertragungen	Gesamtzahl wiedergewonnen (%)	Leere Zona (%)	
Pronucleus-Stadium	Pronucleus-Stadium	71	38(54)	9(13)	5
Kontrolle		49	30(61)	0(0)	10
2-, 4- oder 8-zellig	Pronucleus-Stadium	18	10(56)	3/17)	
Kontrolle		23	19(83)	0(0)	15

Kernspender	1-3 zellig (%)	4-6 zellig (%)	7-9 zellig (%)	10-16 zellig (%)	Morula oder Blastocyst (%)	
Pronucleus-Stadium	14(48)	3(10)	3(10)	2(7)	5(17)	20
Kontrolle	12(40)	2(7)	2(7)	3(10)	11(37)	25
2-, 4- oder 8-zellig	7(100)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	
Kontrolle	8(42)	1(5)	1(5)	1(5)	8(42)	30

Diese Prozentzahlen beziehen sich auf die Anzahl intakter Embryonen, welche aus den Schafoviducten gewonnen wurden.

Die Kontrollembryonen befanden sich im Vorkern- bis zum 8-zelligen Stadium und waren nicht notwendigerweise im gleichen Entwicklungsstadium wie die Kerntransplantat-Embryonen; es war daher nicht möglich, direkte Vergleiche zwischen den erreichten Zellstadien vorzunehmen. Die Kontrollgruppen zeigten jedoch, daß die Embryonen überlebten und sich weiterentwickelten, nachdem sie aus geschlachteten Tieren entnommen, ins Laboratorium transportiert und mehrere Stunden lang bei Raumtemperatur aufbewahrt worden waren. Die Vorkern-Embryonen, bei denen die Nuclei entfernt und wieder eingesetzt worden waren, entwickelten sich im Schafoviduct ebenfalls zu Morula oder Blastocysten. Zwei der Embryonen, welche sich aus den wiedereingesetzten Vorkernen entwickelt hatten, wurden in eine Empfängerkuh übertragen und beide führten zur Geburt von normalen Kälbern. Embryonen, bei denen die Vorkerne durch Kerne aus 2-, 4- oder 8-zelligen Embryonen ersetzt worden waren, entwickelten sich nicht über eine oder zwei Teilungen hinaus.

Ogleich sämtliche Embryonen in Agar eingebettet waren, wurden die meisten von ihnen frei von den Agarblöcken wiedergewonnen. Die Kontrollembryonen waren bei der Wiedergewinnung alle intakt. Von den transferierten, mikromanipulierten Embryonen wurden jedoch etwa 15% mit leerer zona pellucida wiedergewonnen.

Diese Untersuchungen zeigen, daß Kerne aus Rinderzellen im Vorkern-Stadium entnommen werden können und daß das Kernmaterial erfolgreich inseriert werden kann. Zellfusion zwischen Zellen mit Nucleus und Empfänger-Oocyten war in nicht-ionischen Medien möglich und wurde optimiert, wenn die Membrangrenzflächen zwischen der Spenderzelle und der Empfänger-Oocyte senkrecht zur Richtung des elektrischen Fusionsimpulses orientiert waren.

Beispiel 3

In diesem Beispiel wurden 4- bis 32-zellige Embryonen im Blastula-Stadium, entnommen bei der Schlachtung 2 bis 5 Tage nach Östrus, als Spenderzellen ausgewählt. Die Empfänger-Oocyten wurden aus 1 bis 5 mm Follikeln aspiriert, welche aus im Schlachthaus entnommenen Ovarien stammten, die in vitro 22 bis 26 Stunden lang nach dem Verfahren von Critser et al. (Influence of cumulus Cell Association During In Vitro Maturation of Bovine Oocytes on Embryonic Development, Biol. of Reprod. 34, Suppl. 1, 192 (Abstract Nr. 286) (1986)) gereift worden waren, oder es wurden in vivo gereifte Ovocyten bei der Schlachtung 36 Stunden nach Einsetzen des Östrus gewonnen.

Die Empfänger-Oocyten wurden von dem Cumulus oophorus befreit, indem sie 10 Minuten lang in TALP-Hepes Puffermedium mit einem Gehalt an 1 mg/ml Rindertestes Hyaluronidase verwirbelt wurden.

Die gereiften Oocyten wurden nach dem oben im einzelnen beschriebenen Verfahren enukleiert, wobei in einigen Fällen der Polkörper und nur das angrenzende Cytoplasma und in anderen Fällen etwa die Hälfte des Cytoplasmas entfernt wurde.

Enukleation und Transfer wurden in 7,5 µg/ml Cytochalasin B durchgeführt. Die Spenderblastomere mit Nuclei wurden aus den Spenderembryonen abgesaugt und in den perivitellinen Raum der enukleierten Empfänger-Oocyten injiziert. Aktivierung und Fusion wurden durch Dielektrophorese in Zimmerman Zellfusionsmedium nach dem oben genauer beschriebenen Verfahren durchgeführt. Postfusions-Embryonen wurden 16 bis 18 Stunden lang in modifiziertem Tyrodesmedium kultiviert, bevor sie in Agarchips eingebettet und in den abgeordneten Oviduct eines Mutterschafts übertragen wurden.

Nach 5 Tagen in vivo Kultur wurden die Embryonen entnommen und ausgewertet. Die Auswertung der Ergebnisse zeigte, daß die Effizienz der Fusion stieg, wenn etwa die Hälfte des Cytoplasmas aus der Empfänger-Oocyte entfernt worden war und wenn das Spender-Blastomer aus einem 4- bis 16-zelligen Embryo stammte. Die Wirkungsrate dieser Empfänger/Spenderkombination betrug 237 aus 342 entsprechend 69% erfolgreiche Fusionen. Die Effizienz der in vivo Entwicklung bis zum Morula- oder Blastocystenstadium unterschied sich nicht signifikant in Abhängigkeit davon, ob die Empfänger-Oocyte nach einem der beiden Verfahren präpariert worden war (3,7% und 1,9%). Die Entwicklung bis zum Morula- oder Blastocystenstadium war jedoch bei in vivo gereiften Oocyten erfolgreicher (27%) als bei in vitro gereiften Oocyten (1,9%), selbst wenn bei diesen etwa die Hälfte ihres Cytoplasmas entfernt worden war. Anscheinend waren die in vitro gereiften Oocyten nicht vollständig ausgereift. Die Entwicklung der Embryonen, welche sich bis zum Morula- oder Blastocystenstadium entwickelt hatten, schien normal. 14 der Embryonen im Morula- oder Blastulastadium wurden nicht-operativ in einem geeigneten Östrusstadium in die Uteri von Rindern transplantiert, wie dies gewöhnlich mit Embryo-Transplantaten durchgeführt wird. Bei vier Embryonen, welche von drei Mutterkühen getragen wurden, wurde Trächtigkeit ausgelöst. In zwei Fällen führte dies zur Geburt von normalen Kälbern. Die beiden anderen Embryonen wurden zwischen dem 25. und 90. Tag der Trächtigkeit abgestoßen.

Dieses Beispiel zeigt, daß die Übertragung von Nuclei aus 4- bis 16-zelligen Spender-Embryo-Zellen in Empfänger-Oocyten die Entwicklung lebensfähiger Embryonen und schließlich Lebendgeburten zur Folge hat. Diese Ergebnisse zeigen, daß Kerntransplantation verwendet werden kann, um identische Embryonen genetisch zu vervielfachen, so daß Herden von genetisch identischem Vieh gezogen werden können.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Kerntransplantation aus einem Rinderembryo als Spender in eine Empfänger-Oocyte, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - (a) einen membranumschlossenen Kern aus einer Zelle des Spenderembryos isoliert,
 - (b) das chromosomale Kernmaterial aus der Empfänger-Oocyte entfernt, um eine enukleierte Empfänger-Oocyte zu schaffen,
 - (c) den membranumschlossenen Spenderkern so in der enukleierten Empfänger-Oocyte platziert, daß seine Membran an die Membran der Oocyte angrenzt und
 - (d) die Membranen des membranumschlossenen Kerns und der enukleierten Empfänger-Oocyte elektrisch miteinander fusioniert um eine embryonische Einzelzelle zu schaffen, welche den Kern des Spenderembryos besitzt.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der membranumschlossene Kern ein ganzer Blastomer oder ein aus einem Blastomeren aspirierter Karyoplast ist.
3. Verfahren nach den Ansprüchen 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß der membranumschlossene Kern und die enukleierte Empfänger-Oocyte so orientiert werden, daß die Kontaktebene ihrer Membranen in Schritt (d) senkrecht zu der Richtung des elektrischen Stroms liegt.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Empfänger-Oocyte sich im Metaphase-II-Stadium befindet.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß man die Empfänger-Oocyte durch Aspirieren von etwa der Hälfte des neben dem Polkörper befindlichen Cytoplasmas enukleiert, wobei eine halbe, enukleierte membranumschlossene Oocyte zurückbleibt.
6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß die enukleierte Empfänger-Oocyte einen perivitellinen Raum aufweist und man den membranumschlossenen Kern in den perivitellinen Raum der enukleierten Oocyte inseriert.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß man vor Schritt (d) den membranumschlossenen Kern und die enukleierte Empfänger-Oocyte in nicht-ionisches Zellfusionsmedium einbringt.
8. Verfahren zum Klonen von Rinderembryonen, dadurch gekennzeichnet, daß man
 - (a) einen Kern, umschlossen von einer Membran, aus einer einzelnen Zelle eines vielzelligen Rinderembryos als Spender isoliert,
 - (b) eine Empfänger-Oocyte enukleiert,
 - (c) den membranumschlossenen Spender-Kern in den perivitellinen Raum der enukleierten Empfänger-Oocyte einführt,
 - (d) die Zellfusion zwischen den Membranen, welche den Spender-Kern und die enukleierte Empfänger-Oocyte umschließen elektrisch induziert,
 - (e) den durch elektrische Induktion fusionierten Embryo aus Schritt (d) in vitro kultiviert,
 - (f) den kultivierten Embryo aus Schritt (e) in den Oviduct und gegebenenfalls anschließend in den Uterus eines Empfänger-Muttertiers transferiert.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß man in Schritt (a) als membranumschlossenen Spender-Kern einen einzelnen Gesamblastomeren aus dem Spender-Embryo entnimmt oder einen membranumschlossenen Karyoplasten aspiriert, welcher einen Kern aus einer Zelle des Spender-Embryos

enthält

10. Verfahren nach den Ansprüchen 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, daß man vor Schritt (d) den membranumschlossenen Kern und die Oocyte so orientiert, daß die Kontaktebene ihrer Membranen in Schritt (d) senkrecht zu der Richtung des elektrischen Fusionsimpulses liegt.

11. Verfahren nach den Ansprüchen 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß man zwei oder mehrere genetisch identische Embryonen schafft und gegebenenfalls austragen läßt, indem man zwei oder mehrere membranumschlossene Kerne von dem des gleichen vielzelligen Rinderembryo oder von identischen geklonten Rinderembryonen als Spender in enukleierte Oocyten transferiert.

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

- Leerseite -